

機関番号： 33101
 研究種目： 若手研究 (B)
 研究期間： 2007 ~ 2009
 課題番号： 19790142
 研究課題名 (和文) アルツハイマー病マーカーとしての24-ヒドロキシコレステロール解析と治療薬の探索
 研究課題名 (英文) Analysis of 24-hydroxycholesterol as a biomarker of Alzheimer's disease and target of the medicine for Alzheimer's disease.
 研究代表者
 中川 沙織 (NAKAGAWA SAORI)
 新潟薬科大学・薬学部・助教
 研究者番号：30410228

研究成果の概要 (和文) :アルツハイマー病のサロゲートマーカーとしての24S-ヒドロキシコレステロールの血漿中および脳脊髄液中濃度のGC-MS定量法を確立した。レビー小体病患者に応用しアミロイドβ値と比較したところ、どちらも低濃度の傾向を示した。さらに、24S-ヒドロキシコレステロールが有する細胞毒性を軽減する物質を探索したところ、茶由来のポリフェノールに細胞毒性の軽減効果が認められ、アルツハイマー病の新しい治療法の一助として提案できることが示唆された。

研究成果の概要 (英文) : A simple pretreatment method for the determination of 24S-hydroxycholesterol as a surrogate marker of Alzheimer disease in human plasma and human cerebrospinal fluid by gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS) has been developed. It was found a tendency that the concentration levels of 24S-hydroxycholesterol and amyloid β in plasma with Lewy patients have been decreased. Furthermore, we investigate 24S-hydroxycholesterol-mediated cytotoxicity for SH-SY5Y cells, and also explore the anti-cytotoxicity agents. We found the polyphenols from Japanese tea have an anti-cytotoxic effect.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,200,000	0	1,200,000
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	600,000	3,800,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・医療薬学

キーワード：24S-ヒドロキシコレステロール、アルツハイマー病、細胞毒性

1. 研究開始当初の背景

(1) アルツハイマー病バイオマーカー

わが国における認知症の高齢者数は約150万人と推定され、そのうち60~70万人がアルツハイマー病ではないかと考えられている。高齢化が進む中で今後ますます増えることが予想され、社会的にも大きな問題となってくると思われる。アルツハイマー病は、コ

リンエステラーゼ阻害剤のドペネジルによる治療を行うことにより症状の進行を防ぐことができるが、これは早期の段階で有効とされるため、早期診断、早期治療が必要とされる。アルツハイマー病の病理的特徴としてアミロイドβ蛋白(Aβ₄₂)が蓄積した老人斑、リン酸化タウ蛋白が蓄積した神経原繊維変化が挙げられ、アルツハイマー病のマーカー

となるが、アルツハイマー病との相関性は必ずしも証明されていない。その他アルツハイマー病のバイオマーカーとして、近年では、コレステロール代謝物である 24S-ヒドロキシコレステロールが報告されているが、詳細は不明である (Fig. 1, 2)。

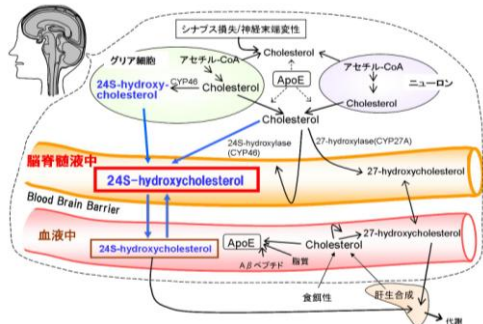


Fig. 1 脳内 24S - ヒドロキシコレステロールの挙動

(2) 24S-ヒドロキシコレステロールの細胞毒性

アルツハイマー病による脳の退化は、神経細胞中の CYP46A1 の減少により、24S-hydroxylase の低下を引き起こし、24S-ヒドロキシコレステロールの脳からの排出を減少させ、さらに血中の 24S-ヒドロキシコレステロールが減少すると考えられる。一方で、アルツハイマー病の中期では、上昇するという報告もあり、24S-ヒドロキシコレステロールがどのようにアルツハイマー病と関わっているのか定かではない。そのため、本研究で 24S-ヒドロキシコレステロールを中心としたコレステロール代謝物がアルツハイマー病とどのように関わっているか明らかにする。

また 24S-ヒドロキシコレステロールの細胞毒性が報告されており、さらに Aβ₄₂ の蓄積は中枢毒によるものといわれており、24S-ヒドロキシコレステロールの毒性とアルツハイマー病発症がどのように関わっているか検討する。

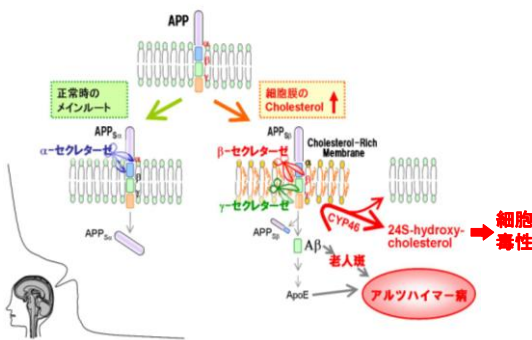


Fig. 2 脳内におけるアルツハイマー病発症とコレステロール類の関係

2. 研究の目的

(1) 24S-ヒドロキシコレステロールとアルツハイマー病との関わりを探るために、24S-ヒドロキシコレステロールの GC-MS 定量法を確立し、脳脊髄液および血漿中濃度測定へ応用する。さらに、アルツハイマー病に特徴的とされる Aβ₄₂ と比較し、アルツハイマー病との関連性を検討する。

(2) 24S-ヒドロキシコレステロールの細胞毒性を確認し、細胞毒性を軽減する物質を提案し、新規アルツハイマー病治療の提案を行う。

3. 研究の方法

(1) 血漿中および脳脊髄液中の 24S-ヒドロキシコレステロールの定量法の確立と検体への応用

血漿 500 μL に、メタノールおよび 10 mol/L の水酸化カリウム溶液を添加し、室温で 1 時間攪拌しながらケン化反応を行い、リン酸で中和した。そこに水およびヘキサンを加え、溶媒抽出を行い、ヘキサン層を分取後、固相抽出 (SI カートリッジ) を行い、ヒドロキシコレステロールを抽出した。トリメチルシリル誘導体化後、GC-MS を用いて定量を行った (Fig. 3.)。

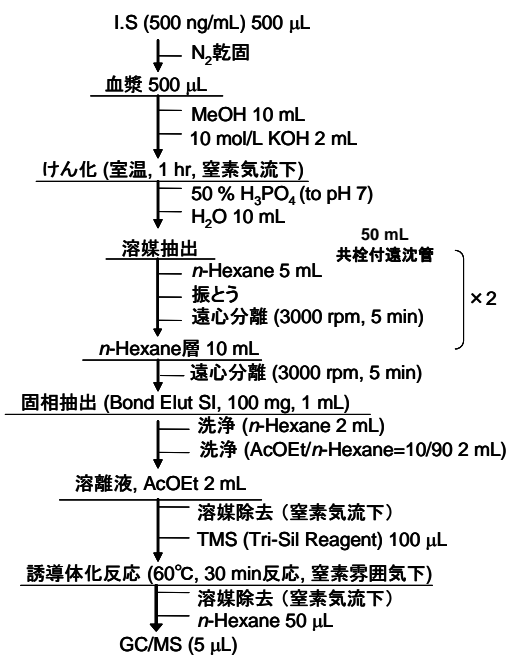


Fig. 3 血漿前処理法

この確立した方法を用いて、健常人の血漿検体へ応用し、非脳神経変性疾患患者およびアルツハイマー病と同じ脳神経変性疾患である Lewy 小体病患者の脳脊髄液検体に応用した。さらに、アルツハイマー病のサロゲートマーカーとして知られているアミロイド β₄₂ を ELISA 法で定量し、24S-ヒドロキシコレステロールと比較した。

(2) 24S-ヒドロキシコレステロールの細胞毒性と毒性軽減効果物質の探索

ヒト神経芽細胞腫由来の SH-SY5Y 細胞を用いて、24S-ヒドロキシコレステロールの細胞毒性を経時的に検討した。細胞毒性の陽性コントロールとして7-ケトコレステロールを用いた。5×10⁴ cells の細胞にヒドロキシコレステロール類を添加し、48 hr 培養後、生細胞を測定した。生細胞の確認には、cell counting kit-8 を用いて生成されるホルマザンを 450 nm の吸光度で測定した。さらに、この系にカテキン類 (Fig. 4) あるいはスタチン系薬物 (フルバスタチン、シンバスタチン、アトルバスタチン、プラバスタチン、ロバスタチンおよびピタバスタチン) を添加し、細胞毒性軽減効果を検討した。

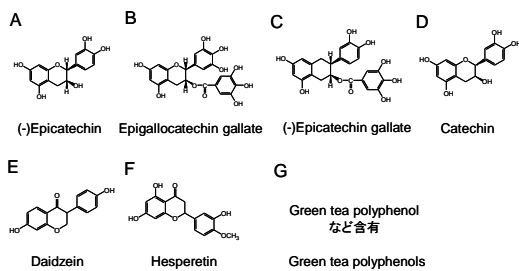


Fig. 4 細胞毒性の軽減効果の検討に用いたカテキン

4. 研究成果

(1) 血漿中および脳脊髄液中の 24S-ヒドロキシコレステロールの定量法の確立と検体への応用

検体中のエステル型ヒドロキシコレステロール類をすべて遊離型にするためのけん化反応は、10 mol/L 水酸化カリウム水溶液を用いることで、内容積 50 mL のガラス製共栓付円錐遠心管内で実施できた (Fig. 5)。けん化後の遊離コレステロール及び遊離ヒドロキシコレステロール類の抽出溶媒に *n*-ヘキサンを用いることで抽出を容易にし、その後の固相抽出操作を連続して行うことが可能であった。固相抽出にシリカカートリッジを用いることで多量のコレステロールとヒド

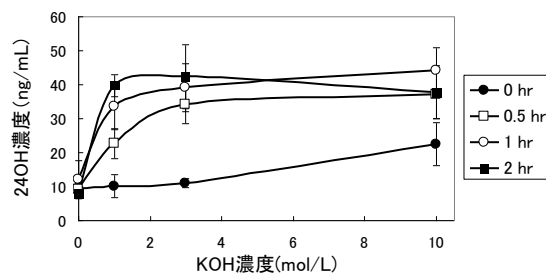


Fig. 5 24S-ヒドロキシコレステロールのけん化反応条件の検討

Table 1 固相抽出の各画分に溶出されるコレステロールとヒドロキシコレステロールの割合

Cartridge	Fraction (solvent)*	C	24OHC	27OHC
NH ₂	F ₀ (hexane)	0	0	0
	F ₁ (ethylacetate/hexane=5/95)	2.8±10	0	0
	F ₂ (ethylacetate)	113.1±15.6	96.3±19.6	103.1±19.6
CN-U	F ₀ (hexane)	0	0	0
	F ₁ (ethylacetate/hexane=5/95)	119.2±31.8	0.4±0.1	0.1±0.2
	F ₂ (ethylacetate)	4.4±4.4	96.9±18.5	70.3±6.6
CN-E	F ₀ (hexane)	1.5±0.9	0	0
	F ₁ (ethylacetate/hexane=1/99)	127.3±2.1	0	0
	F ₂ (ethylacetate)	2.4±0.1	109.3±1.1	105.6±7.8
FL	F ₀ (hexane)	9.6±4.5	0	0
	F ₁ (ethylacetate/hexane=1/99)	91.7±14.2	101.9±13.5	99.4±3.5
	F ₂ (ethylacetate)	0	0	0
SI	F ₀ (hexane)	0	0	0
	F ₁ (ethylacetate/hexane=10/90)	96.9±8.8	0.03±0.06	0.03±0.06
	F ₂ (ethylacetate)	5.1±2.9	99.3±18.9	105.4±30.9
SI	F ₀ (hexane)	0	0	0
	F ₁ (2-propanol/hexane=0.5/99.5)	106.8±9.5	14.6±0.3	0.3±0.4
	F ₂ (2-propanol/hexane=30/70)	6.4±0.8	74.6±13.0	107.1±28.0
2OH	F ₀ (hexane)	0	0	0
	F ₁ (ethylacetate/hexane=1/7)	122.1±13.9	1.0±0.9	0.4±0.2
	F ₂ (ethylacetate/hexane=1/2)	5.2±1.9	118.5±20.4	102.8±19.6

* F₀: sample load fraction, 2 ml; F₁: fraction 1, 2 ml; F₂: fraction 2, 2 ml
Abbreviations: Cholesterol: C, 24S-hydroxycholesterol: 24OHC, 7-hydroxycholesterol: 27OHC, NH₂: Aminopropyl, CN-U: Cyanopropyl(unendcapped), CN-E: (Cyanopropyl-endcapped), FL: Florisil, SI: Silica, 2OH:Diol

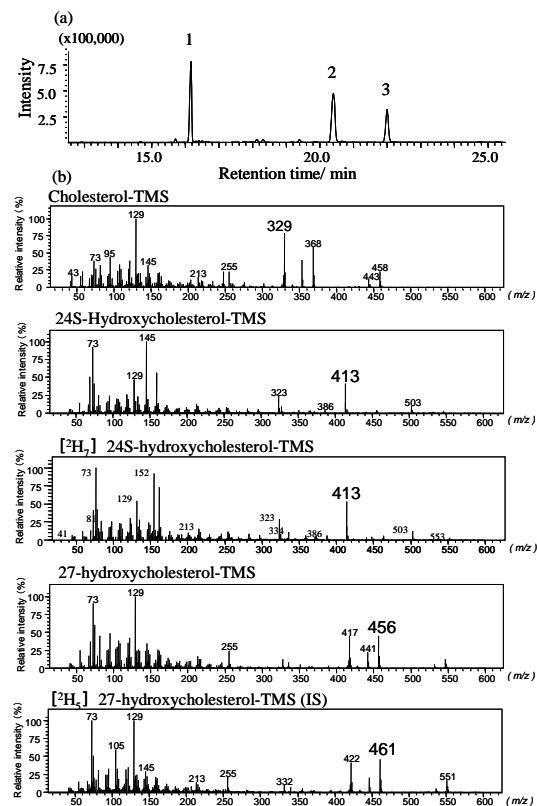


Fig. 6 ヒドロキシコレステロールのクロマトグラムとマススペクトル

ロキシコレステロールを分離することができた (Table 1)。内標準物質は、市販の 24S-ヒドロキシコレステロールの重水素体を用いるとマスフラグメントが重なるため、27-ヒドロキシコレステロールの重水素体を用いることで定量可能となった (Fig 6)。さらにこの測定法を健常人血漿に応用したところ、 57.70 ± 18.16 ng/mL (n=20)とこれまで報告されている濃度とほぼ同様の値を示した。さらに、非脳神経変性疾患およびびまん性 Lewy 小体病患者の脳脊髄液中 24S-ヒドロキシコレステロール定量に応用し、 $A\beta_{42}$ 濃度と比較したところ、どちらもびまん性 Lewy 小体病患者のほうが低値を示した (Table 2)。以上より、24S-ヒドロキシコレステロール濃度は、脳疾患と何らかの関連があることが示唆された。

Table 2 非脳神経変性疾患およびびまん性 Lewy 小体病の脳脊髄液中 24S-ヒドロキシコレステロールおよびアミロイド β 42 濃度の比較

	非脳神経変性疾患患者 (n=27)	びまん性Lewy小体病患者 (n=17)
24S-ヒドロキシコレステロール濃度 (ng/mL, mean \pm SD)	1.56 \pm 0.67	0.97 \pm 0.52
$A\beta_{42}$ 濃度 (pmol/L, mean \pm SD)	126.04 \pm 56.47	74.78 \pm 22.35

(2) 24S-ヒドロキシコレステロールの細胞毒性と毒性軽減効果物質の探索

ヒト神経芽細胞腫由来の SH-SY5Y 細胞を用いてヒドロキシコレステロールの細胞毒性を検討したところ、24S-ヒドロキシコレステロール (50 μ M) 添加 18 時間後には、すでに生存率が 30%以下と、強い細胞毒性が認められた。また、細胞毒性の報告がある 7-ケトコレステロールでも添加 24 時間後に生存率が 30%と細胞毒性が認められた (Fig. 7)。

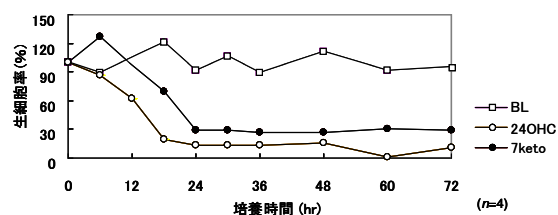
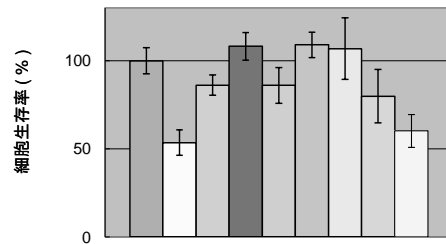


Fig. 7 オキシコレステロールの経時的細胞毒性

さらにこの系に、スタチン系薬物 6 種を添加し、細胞毒性軽減効果を検討したが、大きな細胞毒性の軽減効果は認められなかった (Data not shown)。茶由来のポリフェノール 7 種についても同様に検討を行ったところ、エピカテキン、エピカテキンガラート、エピガロカテキンガラート、カテキン、ダイゼインおよびヘスペリチンに 24S-ヒドロキシコレステロールによって引き起こされる細胞毒性を軽減する効果が認められた (Fig. 8)。



24S-OHC (50 μ M) - + + + + + + + +
カテキン (5 μ M) - - A B C D E F G

Fig. 8 ポリフェノールによる 24S-ヒドロキシコレステロールの細胞毒性軽減効果

脳内で合成され、アルツハイマー病と関係のある 24S-ヒドロキシコレステロールの持つ細胞毒性に対して、茶由来のポリフェノールに細胞毒性を軽減する効果が認められ、アルツハイマー病の新しい治療法の一助として提案できることが示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 6 件)

1. 平山哲、中川沙織、大和進、三井田孝：I. 脂質・コレステロール 2. コレステロール合成および吸収マーカー, *The Lipid*, 21:20-26, 2010. 査読有
2. Yamato S, Shinohara K, Nakagawa S, Kubota A, Inamura K, Watanabe G, Hirayama S, Miida T, Ohta S: HPLC determination of ketone bodies in human plasma by precolumn derivatization with p-nitrobenzene diazonium fluoroborate. *Anal Biochem*. 384(1), 145-150, 2009. 査読有
3. 中川沙織、大和進: ドライケミストリー, *ぶんせき*, 410:70-75, 2009. 査読有
4. 山崎怜子、中川沙織、田辺頸子、池内健、三井田孝、大和進: ガスクロマトグラフィー/質量分析法によるヒト脳脊髄液中の 24S-ヒドロキシコレステロールの定量。分析化学 57(9), 707-713, 2008. 査読有
5. 下枝貞彦、中澤一純、小林光、中川沙織、大和進、笹木睦子、河野健治、太田伸: 血液内科領域におけるポリコナゾール血中濃度測定 of 臨床的意義。医療薬学 34(7), 638-643, 2008. 査読有
6. Nakagawa S, Suzuki R, Yamazaki R, Kusuha Y, Mitsumoto S, Kobayashi H, Shimoeda S, Ohta S, Yamato S: Determination of the antifungal agent voriconazole in human plasma using a simple column-switching high-performance liquid chromatography and

its application to a pharmacokinetic study.
Chem Pharm Bull.56:328-331, 2008. 査読有

[学会発表] (計 30 件)

1. 長谷川絵梨、中川沙織、平山哲、三井田孝、眞山義民、長坂博範、大和進: GC-MS 定量法を用いた血漿中 oxysterol 濃度と加齢との関連性. 第 50 回日本臨床化学会年次学術集会(山梨)、2010 年 9 月予定
2. 桑原直子、中川沙織、平山哲、三井田孝、大和進: LC-MS/MS を用いる血漿中インプレノイド測定法の開発. 第 50 回日本臨床化学会年次学術集会(山梨)、2010 年 9 月予定
3. 上村友実子、中川沙織、平山哲、三井田孝、大和進: エゼチミブ投与患者の血漿中コレステロール吸収・合成・代謝物の定量. 第 50 回日本臨床化学会年次学術集会(山梨)、2010 年 9 月予定
4. 桑原直子、中川沙織、下枝貞彦、太田伸、大和進: サイクリングプローブ法を用いる薬物代謝酵素 CYP2C19 の非侵襲的な塩基多型測定法. 日本薬学会第 130 年会 (岡山)、2010 年 3 月
5. 上村友実子、平澤美奈子、小林美智子、中川沙織、大和進: GC-MS を用いる HepG2 細胞内コレステロール生合成前駆体の定量法の確立とその応用. 日本薬学会第 130 年会 (岡山)、2010 年 3 月
6. 長谷川絵梨、高橋香織、中川沙織、大和進: 24S-hydroxycholesterol などのオキシステロール類における細胞毒性. 日本薬学会第 130 年会 (岡山)、2010 年 3 月
7. 桑原直子、中川沙織、小林光、下枝貞彦、太田伸、大和進: カラムスイッチング法を用いる血漿中ミカファンギンの簡便な定量法の開発. 第 52 回日本薬学会関東支部大会 (埼玉)、2009 年 10 月
8. 長谷川絵梨、中川沙織、田辺顕子、立川英一、大和進: Sweeping-MEKC 法によるステロイドホルモン一斉分析法の開発とウシ副腎皮質培養細胞系を用いる抗ストレス薬評価系への応用. 日本分析化学会第 58 年会(北海道)、2009 年 9 月
9. 田辺顕子、上村友実子、中川沙織、大和進: 5 α -コレスタンおよびエピコプロスタノールを内標準物質に用いる血漿中コレステロール合成・吸収マーカーの GC-MS 測定法. 日本分析化学会第 58 年会 (北海道)、2009 年 9 月
10. 青柳克規、中川沙織、平山哲、三井田孝、大和進: 糖尿病治療効果の指標としての血漿中ケトン体定量の有効性. 第 49 回日本臨床化学会年次学術集会(長崎)、2009 年 9 月
11. Nakagawa S, Tachikawa E, Yamato S: Simultaneous determination of pregnenolone and 17-hydroxypregnenolone secreted by bovine adrenal cortex cells using immobilized cholesterol oxidase as a pre-column reactor. Euro Analysis 2009(Innsbruck), 2009 **Travel Grant 受賞**
12. Hasegawa E, Nakagawa S, Tanabe A, Tachikawa E, Yamato S: Simultaneous determination of ten steroids using sweeping-micellar electrokinetic capillary chromatography and its application to bovine adrenal cortex cells. Euro Analysis 2009(Innsbruck), 2009
13. 中川沙織、藤原美菜子、田辺顕子、大和進: アルツハイマー病の発症に関連するヒドロキシコレステロール類の細胞毒性. 日本薬学会第 129 年会 (京都)、2009 年 3 月
14. 長谷川絵梨、中川沙織、田辺顕子、立川英一、大和進: キャピラリー電気泳動法を用いるステロイドホルモンの一斉分析と培養細胞系への応用. 日本薬学会第 129 年会 (京都)、2009 年 3 月
15. 大和進、中川沙織、斎藤直美、立川英一: 固定化酵素/セミマイクロ HPLC を用いる副腎ステロイド定量法による抗ストレス薬の評価. 日本薬学会第 129 年会 (京都)、2009 年 3 月
16. 田辺顕子、中川沙織、二瓶奈津子、上村友実子、平山哲、三井田孝、大和進: 血漿中の植物ステロイド類の定量を指標とする高コレステロール血症治療薬の評価. 日本薬学会第 129 年会 (京都)、2009 年 3 月
17. 五十嵐亮一、中川沙織、田辺顕子、立川英一、大和進: 副腎ストレスホルモンのセミマイクロ HPLC 同時定量法の応用. 第 52 回日本薬学会関東支部大会 (千葉)、2008 年 10 月 **優秀発表 (ポスター) 受賞**
18. 長谷川絵梨、山崎怜子、中川沙織、田辺顕子、三井田孝、大和進: アルツハイマー病バイオマーカーとしての 24S-ヒドロキシコレステロールの GC/MS 定量における前処理法の改良. 日本分析化学会第 57 年会 (福岡)、2008 年 9 月 **若手ポスター賞受賞**
19. 中川沙織: 〈トピックス〉 コレステロールの合成・吸収・代謝マーカー. 第 26 回日本臨床化学会甲信越支部総会(新潟)、2008 年 6 月
20. 中川沙織、山崎怜子、田辺顕子、大和進: アルツハイマー病マーカーとしての 24-ヒドロキシコレステロール定量のための前処理法 - コレステロールオキシダーゼ処

- 理と固相抽出法 - 日本薬学会第 128 年会(横浜)、2008 年 3 月
21. 山崎怜子、中川沙織、田辺顕子、池内健、三井田孝、大和進：アルツハイマー病マーカーとしての意義解明を指向した 24S-ヒドロキシコレステロールの高感度 GC/MS 定量. 日本薬学会第 128 年会(横浜)、2008 年 3 月
 22. 大和進、中川沙織、田辺顕子、小野真樹、明戸孝夫、立川英一：抗ストレス薬の作用評価を目的とするステロイド類定量法の開発と応用. 日本薬学会第 128 年会(横浜)、2008 年 3 月
 23. 篠原久美子、中川沙織、田辺顕子、稲村勝志、渡邊彦、平山哲、三井田孝、大和進：糖代謝異常の一指標としての血漿中ケトン体 HPLC 定量法の開発と臨床応用. 日本薬学会第 128 年会(横浜)、2008 年 3 月
 24. 田辺顕子、山崎怜子、中川沙織、平山哲、三井田孝、大和進：GC/MS を用いる高コレステロール血症患者の血漿中植物ステロールの定量. 日本薬学会第 128 年会(横浜)、2008 年 3 月
 25. 中川沙織、大和進、三井田孝：アルツハイマー病マーカーとしての 24S-ヒドロキシコレステロールの定量法の開発. 第 4 回若手脂質研究者の集い(大阪)、2007 年 11 月
 26. 篠原久美子、中川沙織、田辺顕子、平山哲、三井田孝、大和進：糖代謝異常の早期発見につながる血中 3-ヒドロキシ酪酸の定量. 第 51 回日本薬学会関東支部総会(東京)、2007 年 10 月
 27. 山崎怜子、中川沙織、田辺顕子、三井田孝、大和進：アルツハイマー病バイオマーカーとしての 24S-ヒドロキシコレステロールの GC/MS 定量. 第 51 回日本薬学会関東支部総会(東京)、2007 年 10 月
 28. 中川沙織、斉藤直美、清水章野、田辺顕子、立川英一、大和進：副腎皮質培養細胞系を用いる抗ストレス薬評価を目的としたプレグネノロンおよび 17-ヒドロキシプレグネノロン定量法の開発. 日本分析化学会第 56 年会、(徳島)、2007 年 9 月
 29. 篠原久美子、佐々木優子、百瀬瑠美、中川沙織、田辺顕子、大和進：メタボリックシンドローム予防の一指標となりうる血中ケトン体の定量法. 第 4 回 新潟食品科学・バイオフィオーラム(新潟)、2007 年 7 月
 30. 山崎怜子、小林恭子、木樽恵里、中川沙織、田辺顕子、三井田孝、大和進：生体試料中のヒドロキシコレステロール類の GC/MS 定量に必要な前処理法の検討. 第 20 回バイオメディカル分析科学シンポジウム(東

京)、2007 年 7 月

[図書] (計 1 件)

1. 大和進、田辺顕子、中川沙織：治療薬などによる食餌由来コレステロールの吸収抑制効果を評価する研究に有用なガスクロマトグラフィー/質量分析法. 日本薬学会物理系薬学部会・分析化学担当教員会議(編)：薬学分析科学の最前線、じほう、120-121、2009.

[その他]

新潟薬科大学薬学部薬品分析化学研究室
ホームページ

(<http://www.nupals.ac.jp/~analchem/>)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中川 沙織 (NAKAGAWA SAORI)

新潟薬科大学・薬学部・助教

研究者番号：30410228

(2) 研究分担者

なし

研究者番号：

(3) 連携研究者

なし

研究者番号：